

OBTENCION DE PLASTICOS BIODEGRADABLES POR MICROORGANISMOS ACUMULADORES DE POLIHIDROXIALCANOATOS EN CULTIVOS MIXTOS (LODOS ACTIVADOS) UTILIZANDO EFLUENTES DE LA INDUSTRIA

Alzate Marin Juan C.¹, Caravelli Alejandro H.¹, Zaritzky Noemí E.^{1,2}

¹Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), CCT – La Plata – CONICET, UNLP, 47 y 116 (B1900AJJ) La Plata, Argentina.

²Depto de Ingeniería Química . Facultad de Ingeniería . Universidad Nacional de La Plata y E-mail: ing.juankal@yahoo.es (Alzate Marin J.C.)

Palabras claves: polihidroxialcanoatos, lodos activados, acetato, suero de queso, glicerol.

Introducción

En la actualidad existe un gran interés por la producción de plásticos biodegradables; su gran importancia se basa en la búsqueda de sustitutos de plásticos derivados de origen petroquímico, lo cual permite disminuir el impacto ambiental, reducir su persistencia en el medio ambiente y utilizar recursos renovables. Los PHAs son biopoliésteres sintetizados por bacterias como reserva intracelular de carbono y energía. Estos compuestos químicos tienen características físicas similares a los plásticos derivados del petróleo tales como la densidad, fuerza de tensión, elongación y punto de fusión, con la ventaja que los PHA se degradan completamente a CO₂ y H₂O.

El costo de producción de PHA es superior al de los plásticos convencionales debido a que normalmente está basada en la utilización de cultivos puros incrementando los costos asociados a la esterilidad del proceso, fuente de carbono comercial, equipamiento de operación y control. El uso de cultivos mixtos, como el caso de lodos activados, y de efluentes ricos en carbono permiten reducir los costos de producción de PHA (Dai et al., 2007). Los efluentes que pueden ser utilizados para este fin son los generados en industrias alimenticias y producción de biodiesel, entre otros.

La producción de PHA requiere: i) una etapa de selección de microorganismos en un reactor Batch Secuencial, con etapas sucesivas bajo condiciones disponibilidad/limitación de fuente de carbono y energía (feast/famine) y ii) una etapa de producción de PHA en sistema batch (Serafim et al., 2008). Cuando se emplean sustratos ricos en carbohidratos se requiere una etapa anaeróbica fermentativa previa para transformar los carbohidratos en ácidos grasos volátiles y otros ácidos carboxílicos, los cuales pueden ser luego utilizados en las etapas siguiente de selección de microorganismos y acumulación de PHA (Albuquerque et al. 2007).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la factibilidad de producción de PHA, a escala laboratorio, utilizando cultivos de lodos activados bajo condiciones aeróbicas y diferentes fuentes de carbono: acetato, suero de queso con alto contenido de lactosa hidrolizada (efluente de la industria láctea) y glicerol puro (subproducto de la planta de biodiesel). Se propone un proceso de producción de PHA basado únicamente en 2 etapas: selección de microorganismos (SBR) y producción (Batch). Como objetivos específicos se propone: a) Detectar el PHA en los cultivos por tinción con Sudan Black y Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR), b) Monitorear la acumulación de PHA del reactor batch por análisis de imágenes, c) Comparar los diferentes sistemas con respecto a parámetros cinéticos y estequiométricos de crecimiento microbiano y producción de PHA, d) Extraer el PHA de la biomasa, determinar el rendimiento, pureza y composición del polímero.

Parte experimental

Medios de cultivo y reactores

Etapas de selección del cultivo mixto: Se emplearon reactores discontinuos secuenciales (SBR) a escala laboratorio (2 L.) y diferentes medios de cultivo según la fuente de carbono y energía: acetato de sodio, suero de queso y mezclas de suero de queso con glicerol (50/50). Los medios de cultivo presentaron las siguientes concentraciones de demanda química de oxígeno (DQO), nitrógeno (N) y fósforo (P): 4095 mgDQO/L, 409 mgN/L y 204 mgP/L. Los reactores SBR fueron operados con una secuencia temporal de diferentes fases: reacción, sedimentación y purga del sobrenadante. Se evaluó la estabilidad de cada SBR mediante la determinación de los siguientes parámetros físico-químicos a lo largo de diferentes ciclos: ortofosfato ($\text{PO}_4\text{-P}$, mgP/L), amonio ($\text{NH}_3\text{-N}$, mgN/L), sustrato orgánico como DQO soluble (DQO_S , mg/L) y concentración de biomasa determinada como DQO (DQO_B , mg/L). DQO_B correspondió a la diferencia entre DQO total (DQO_T) y DQO_S .

Etapas de producción de PHA: Se emplearon reactores batch a escala laboratorio (1 L). Se operaron en forma aeróbica a temperatura ambiente. Se utilizó la biomasa procedente de los diferentes SBRs. Los diferentes medios de cultivo contenían acetato de sodio, suero de queso, suero de queso y glicerol (50/50), con concentraciones de N y P 20 veces inferiores a las utilizadas en la etapa de selección. Para cada sistema batch se determinaron los siguientes parámetros físico-químicos a lo largo de cada ensayo: DQO_S (mg/L); DQO_T (mg/L) y DQO_B (mg/L). La síntesis de PHA se detectó por tinción con Sudan Black y FTIR. La producción de PHA se monitoreó por tinción con Sudan Black acoplada a análisis de imágenes microscópicas.

Análisis químico y cuantificación de PHA

Las concentraciones de ortofosfato, nitrógeno amoniacal y DQO fueron determinadas por espectrofotometría utilizando reactivos comerciales (Hach). Para determinar $\text{PO}_4\text{-P}$, $\text{NH}_3\text{-N}$ y DQO_S se centrifugaron 35 mL del cultivo (13000 rpm, 10 min.) y se filtró el sobrenadante con membranas de 0,45 μm de tamaño de poro. La concentración de $\text{PO}_4\text{-P}$ fue determinada luego de reaccionar con vanadato-molibdato en medio ácido (Método Hach N° 8114). Nitrógeno amoniacal fue medido por el método de Nessler (Método Hach N° 8038).

Se determinó el rendimiento de biomasa ($y_{\text{X/S}}$, mg DQO_B /mg DQO_S) a partir de la pendiente de los gráficos: concentración de biomasa (DQO_B) vs. sustrato orgánico consumido ($\text{DQO}_{\text{SO}} - \text{DQO}_\text{S}$), siendo DQO_{SO} la concentración de sustrato orgánico al inicio de cada ciclo del SBR o inicio de cada batch de producción de PHA y DQO_S el valor correspondiente a diferentes tiempos.

A diferentes tiempos de operación de los reactores batch, se determinó la producción de PHA (P_{PHA}) de los lodos activados mediante el análisis de imágenes microscópicas. Se tomaban dos muestras (15 μL) con una micropipeta y se extendían uniformemente sobre portaobjetos. Se procedió a la tinción de los preparados microscópicos con Sudan Black (Jenkins y col., 1993). Los preparados fueron observados por microscopía de contraste de fases con aumento de 1000X usando un microscopio Leica DMLB con cámara fotográfica. Para cada preparado microscópico, se tomaban 10-20 micrografías. Las imágenes microscópicas fueron analizadas con el software Image-Pro Plus 6.0. Se determinó el área ocupada por los gránulos intracelulares de PHA de los flóculos de lodos activados (A_G , μm^2), el área total de dichos flóculos (A_T , μm^2) y su relación $P_{\text{PHA}} = A_\text{G}/A_\text{T}$.

Resultados y discusión

Reactor SBR con medio de cultivo basado en acetato de sodio

El SBR fue operado con ciclos repetitivos de 84 hs y secuencia temporal de diferentes fases: reacción (83 hs), sedimentación (45 min.) y purga del sobrenadante (15 min.). Se trabajó con un tiempo de residencia celular (TRC) de 10 días y un tiempo de residencia hidráulico (TRH) de 4 días. El reactor presentó crecimiento disperso con pésimas propiedades de sedimentación, además el cultivo se volvió muy viscoso con formación de abundante espuma generada por la aireación en la fase de reacción. El SBR fue detenido, sin poder evaluarse la capacidad de producción de PHA al utilizar acetato como fuente de carbono en sistema batch.

Reactor SBR con medio de cultivo basado en suero de queso

El cultivo presentó ciclos típicos "feast/famine". Durante las primeras 24-32 hs se produjo el consumo total de la fuente de carbono, correspondiendo este período a la fase "feast" o de disponibilidad de sustrato orgánico externo. La duración de la fase "feast" de los diferentes ciclos estuvo determinada por la velocidad de consumo de sustrato orgánico. Asociado al consumo de sustrato se observó un incremento gradual de la biomasa microbiana. Durante dicho período, se observó un consumo significativo de nitrógeno amoniacal y en menor grado de ortofosfato, siendo también asociado al crecimiento de la biomasa. Durante el tiempo restante del ciclo (fase "famine"), la concentración de biomasa decayó ligeramente (Figura 1). El decaimiento de la biomasa puso de manifiesto la ocurrencia de fenómenos de mantenimiento celular a expensas del consumo de sustancias de reserva intracelular.

La velocidad inicial de consumo de DQO_S (r_s , mgDQO/(L h)), determinada a partir de los datos medidos durante las primeras 8-10 hs de cultivo, resultó dependiente de la concentración de biomasa al inicio de cada ciclo (DQO_{BO}) y de la temperatura. La velocidad específica de consumo de sustrato (q_s , mgDQO/(DQO_B h)) se estimó a partir del cociente entre r_s y DQO_{BO} . La dependencia de q_s con la temperatura no permite utilizar dicho parámetro para determinar la estabilidad del sistema (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros químicos, cinéticos y estequiométricos del SBR operado con medio de cultivo basado en suero de queso para los diferentes ciclos.

Nº Ciclo	TRC	Temp (°C)	DQO_{BO} (mgDQO _B /L)	r_s (mgDQO _S /(Lh))	q_s (mgDQO _S /(gDQO _B h))	$Y_{X/S}$ (DQO _B /DQO _S)
2	0,7	18 ± 1	3115	229	73	0.83
4	1,4	13 ± 4	2360	154	65	0.69
14	4,9	19 ± 2	1882	200	106	0.62
22	7,7	13 ± 2	1888	120	63	0.69

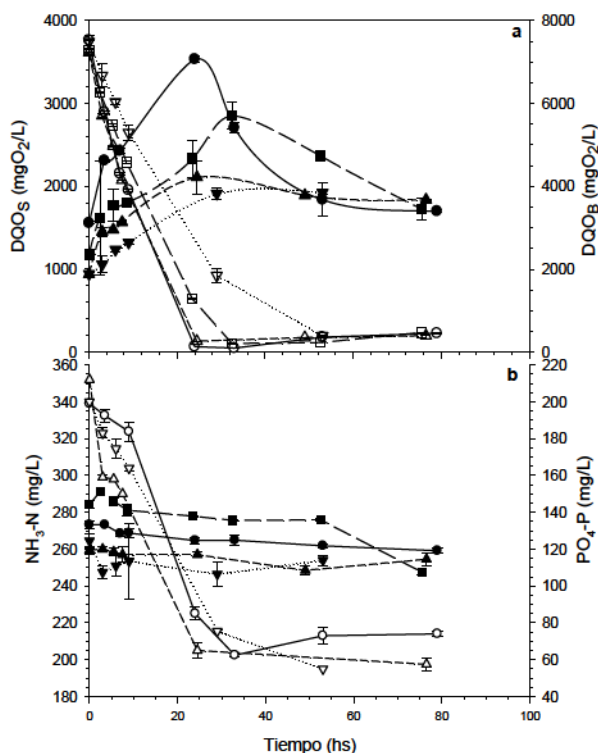


Figura 1. Ciclos del SBR operado con medio de cultivo basado en suero de queso para diferentes TRC. a) DQO soluble (DQO_S , mg/L): símbolos vacíos; DQO de biomasa (DQO_B , mg/L): símbolos llenos. b) Nitrógeno amoniacal ($N-NH_3$, mg/L): símbolos vacíos; Ortofosfato ($P-PO_4^{3-}$, mg/L): símbolos llenos. (●,○) Ciclo 2, TRC= 0,7, (■,□) Ciclo 4, TRC= 1,4, (▲,△) Ciclo 14, TRC= 4,9, (▼,▽) Ciclo 22, TRC= 7,7.

El rendimiento de la biomasa no presentó una tendencia definida a lo largo de los sucesivos ciclos del SBR (Tabla 1). Debe destacarse que en los diferentes ciclos se alcanzó la concentración de biomasa máxima (DQO_{BM}) al final de la fase "feast". Esta DQO_{BM} disminuyó progresivamente con el tiempo de operación del reactor, alcanzando un valor relativamente constante ($3900-4200 \text{ mgDQO/L}$) luego de 4,9 TRC (Figura 1). De esta manera, el sistema requirió más de 4 TRC para alcanzar el estado estable. Bajo condiciones de estabilidad, el rendimiento de biomasa fue $0,65 \pm 0,05 \text{ mgDQO}_B/\text{mgDQO}_S$.

Producción de PHA en reactor batch con medio de cultivo basado en suero de queso

Una vez alcanzadas las condiciones de estado estable en el SBR, se realizaron ensayos de producción de PHA en sistema batch aeróbico. En el reactor batch se observó la acumulación de PHA por tinción con Sudan Black y observación microscópica (Figura 2a). La técnica espectroscópica permitió confirmar la presencia de PHA intracelular.

En la Figura 2b se presentan las curvas de consumo de sustrato orgánico, incremento de biomasa y producción de PHA correspondientes al sistema batch con lodos obtenidos al final del ciclo N° 22 del SBR (7,7 TRC). Se requirieron 48hs para la remoción del 90% del sustrato. La concentración de biomasa aumentó progresivamente a medida que se consumía el sustrato hasta las 24 hs de cultivo; el consumo posterior de sustrato no produjo un incremento significativo de biomasa. El aumento de biomasa estuvo asociado fundamentalmente a la síntesis y acumulación de PHA, pues el medio de cultivo utilizado estuvo limitado en nitrógeno y fósforo. Luego de 24 hs de cultivo, se determinó un valor de P_{PHA} de $30,0 \pm 7,7$, lo que implicó un incremento de 4,4 veces respecto del contenido de PHA al inicio del batch. Luego, el contenido intracelular de PHA no se incrementó de manera significativa resultando un P_{PHA} de $37,8 \pm 12,8$ luego de 48 hs de cultivo ($p > 0,05$, Figura 2b).

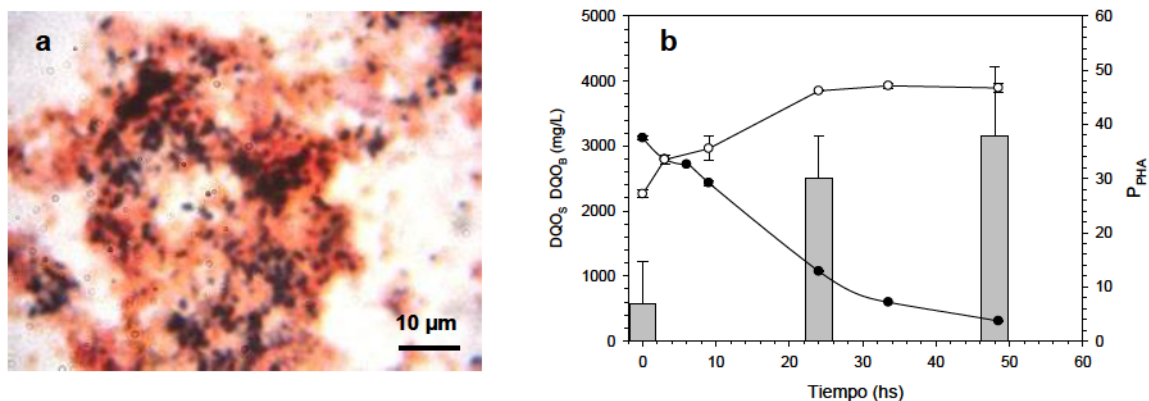


Figura 2. Producción de PHA en reactor batch (TRC= 7,7) utilizando suero de queso. a) Micrografía de lodos activados con tinción Sudan Black luego de 48 hs de cultivo. b) Consumo de sustrato orgánico, incremento de biomasa y producción de PHA en función del tiempo (hs): (●) DQO soluble (DQO_S , mg/L). (○) DQO de biomasa (DQO_B , mg/L). Barras verticales llenas: Producción de PHA (P_{PHA}).

Se determinó una velocidad específica de consumo de sustrato de $39 \pm 2,8$ $\text{mgDQO}_S/(\text{DQO}_B\text{h})$, siendo significativamente inferior ($p < 0,05$) respecto al cultivo limitado en la fuente de carbono y energía (> 60 $\text{mgDQO}_S/(\text{DQO}_B\text{h})$, Tabla 1). Esto es debido a que bajo condiciones limitadas en sustrato orgánico, como las observadas en el SBR, la competencia microbiana por el mismo se incrementa, resultando velocidades de consumo mayores a las determinadas en cultivos limitados en algún macro-nutriente como el nitrógeno o fósforo. El rendimiento de biomasa fue $0,65 \pm 0,03 \text{mgDQO}_B/\text{mgDQO}_S$, el cual no resultó significativamente diferente ($p > 0,05$) al valor determinado bajo condiciones de estabilidad del SBR ($0,65 \pm 0,05 \text{mgDQO}_B/\text{mgDQO}_S$).

Reactor SBR con medio de cultivo basado en suero de queso y glicerol

En la Tabla 2 se presentan la velocidad de consumo de sustrato orgánico (r_s , $\text{mg}/(\text{L h})$), la velocidad específica de consumo de sustrato (q_s , $\text{mg}/(\text{DQO}_B \text{ h})$) y el rendimiento de biomasa ($y_{x/s}$, $\text{mgDQO}_B/\text{mgDQO}_S$) para los diferentes ciclos estudiados. El parámetro r_s fue determinado a partir de los datos medidos entre las 3 y 24 hs de cultivo, debido a que el cultivo presentó una breve fase inicial con relativamente bajo consumo de sustrato. Bajo condiciones de estabilidad se observó que el rendimiento de biomasa fue $0,54 \pm 0,06 \text{mgDQO}_B/\text{mgDQO}_S$, no difiriendo significativamente del alcanzado en el SBR con el medio de cultivo basado únicamente en suero de queso como fuente de carbono y energía.

Tabla 2. Parámetros químicos, cinéticos y estequiométricos del SBR operado con medio de cultivo basado en suero de queso y glicerol para los diferentes ciclos.

Nº Ciclo	TRC	Temp (°C)	DQO_{BO} (mgDQO _B /L)	r_s (mgDQO _S /(Lh))	q_s (mgDQO _S /(gDQO _B h))	$y_{x/s}$ DQO _B /DQO _S
5	1,8	14 ± 2	1660	103	62	0,47
9	3,2	19 ± 1	1848	122	66	0,50
13	4,6	18 ± 2	2021	128	63	0,58

Producción de PHA en reactor batch con medio de cultivo basado en suero de queso y glicerol

La producción de PHA se realizó con lodos del reactor batch obtenidos al final del ciclo N° 13 del SBR (4,6 TRC). La velocidad específica de consumo de sustrato resultó $39 \pm 0,5 \text{ mgDQO}_S/(\text{DQO}_{Bh})$, siendo significativamente inferior respecto a condiciones limitadas en carbono del SBR. El rendimiento de biomasa fue $0,60 \pm 0,09 \text{ mgDQO}_B/\text{mgDQO}_S$, no difiriendo significativamente ($p > 0,05$) del valor determinado bajo condiciones de estabilidad del SBR.

Luego de 48 hs de cultivo se determinó un valor de P_{PHA} de $20,5 \pm 10,0$, el cual resultó significativamente inferior ($p < 0,05$) al determinado en el ensayo de producción de PHA utilizando suero de queso ($37,8 \pm 12,8$). Cabe destacar que el rendimiento de biomasa no difirió significativamente entre ambos procesos ($p > 0,05$).

Cuantificación y caracterización del PHA producido a partir de suero de queso

Una vez que se alcanzó la máxima acumulación del polímero, se extrajo la biomasa del reactor batch. Se procedió a la extracción del PHA de la biomasa seca y posterior precipitación. El rendimiento del polímero resultó 13,2 % (gPHA/gST) con un grado de pureza de 95,4%. El PHA correspondió al co-polímero P(HB-HV): 95,4% de HB y 4,6% de HV (mol:mol), según se determinó por espectrofotometría UV.

Conclusiones

El PHA fue detectado por tinción con Sudan Black y FTIR. Se determinó la producción de PHA de los cultivos batch, para los sustratos estudiados, mediante tinción con Sudan Black acoplada a análisis de imágenes. Esta técnica permitió determinar el punto final del sistema de producción de PHA. El suero de queso resultó adecuado para la selección de un cultivo mixto con elevada capacidad de almacenamiento de PHA. El polímero producido en batch utilizando suero de queso presentó un rendimiento de 13,2 % (gPHA/gST) con un grado de pureza de 95,4%. Un efluente conteniendo suero de queso y glicerol generó un cultivo de lodos activados con similares parámetros cinéticos y estequiométricos que los obtenidos utilizando suero. No obstante, la producción de PHA basada en mezclas de suero de queso y glicerol resultó menor, requiriéndose optimizar la estrategia de alimentación del sustrato carbonáceo en la etapa de selección y/o producción de dicho sistema.

Bibliografía

- Albuquerque M.G.E., Eiroa M., Torres C., Nunes B.R., Reis M.A.M. (2007) Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *Journal of Biotechnology* 130, 411–421.
- Dai Y., Yuan Z., Jack K., Keller J. (2007) Production of targeted poly(3-hydroxyalkanoates) copolymers by glycogen accumulating organisms using acetate as sole carbon source. *J. Biotechnol.* 129, 489–497.
- Jenkins D., Richard M.G., Daigger G.T. (1993) Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming. 2nd Edition. Lewis Publishers, Inc., Chelsea, Michigan.
- Serafim L.S., Lemos P.C., Albuquerque M.G.E., Reis M.A.M. (2008) Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 615–628.